

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16283

研究課題名(和文) 記憶B細胞の生存ニッチに重要な因子・細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of the factors required for the survival niche of B cell memory.

研究代表者

小池 拓矢 (Koike, Takuya)

大阪大学・感染症総合教育研究拠点・特別研究員 (PD)

研究者番号：10855456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞が関与する免疫記憶は記憶B細胞と長寿命形質細胞からなるが、これらの細胞の長期生存機構は未だ不明である。我々は記憶B細胞の長期生存にはBAFFが重要であることを見出した。長寿命形質細胞を識別可能な分子マーカーなかったため、形質細胞タイムスタンプマウスを作製し、生存期間に基づいて長寿命形質細胞を判別する系を作製した。この系を用いた解析により、骨髄に入った形質細胞の一部のみが長寿命形質細胞となることを発見した。さらに、短寿命形質細胞は骨髄で動いているが、長寿命形質細胞は静止していた。この結果は骨髄の中の生存ニッチに形質細胞が生着することが形質細胞の長寿命化に重要であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長寿命形質細胞の判別方法を明確にし、その形成機構について重要な観察を示した。この知見は長寿命形質細胞の生存機構のより詳細な解析を可能し、長年不明であった免疫記憶の維持機構を解明する手助けになる。これにより、長期に継続するワクチンの開発の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Immune memory involving B cells consists of memory B cells and long-lived plasma cells, but the mechanism of long-term survival of these cells remains unclear. We found that BAFF is important for the long-term survival of memory B cells. Since there were no molecular markers that could identify long-lived plasma cells, we generated a plasma cell time-stamping mouse system to discriminate long-lived plasma cells based on survival time. Using this system, we found that only small population of the plasma cells that entered the bone marrow enter B220^{lo}MHC-1110 long-lived plasma cell pool. Furthermore, the short-lived plasma cells were motile and migratory in the bone marrow, while the long-lived plasma cells were immobilized. These observations suggest that plasma cells behavior in BM is dynamically altered during their differentiation to B220^{lo}MHC-1110 long lived plasma cells and that strength or stability of contact with the BM niche might be associated with PC longevity.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶 記憶B細胞 長寿命形質細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスをはじめとする病原体等の再感染時の防御の主体は初回感染時に形成された記憶 B 細胞による迅速な中和抗体の産生である。また、記憶 B 細胞は、抗原受容体を再改変することで変異型ウイルスにも応答可能であることから、インフルエンザウイルス・HIV など致死率の高い変異ウイルスのワクチン開発の主要ターゲットになっている。抗原に反応したナイーブ B 細胞はヘルパー T 細胞からの刺激により増殖して、胚中心と呼ばれる微小環境を形成する。胚中心では、体細胞超突然変異によって B 細胞の抗原受容体のレパトアが多様化し、抗原に高い親和性をもつ B 細胞が選択されることで、抗原受容体の親和性が成熟する。さらに、親和性が成熟した一部の B 細胞は記憶 B 細胞へと分化する。近年、記憶 B 細胞と胚中心 B 細胞の中間的性質をもち胚中心の辺縁部に存在する細胞が同定され、これが記憶 B 細胞の前駆細胞 (pre-記憶 B 細胞)であることが示された (Laidlaw et al., J. Exp. Med., 2017)。Laidlaw らの報告から胚中心 B 細胞の記憶 B 細胞への移行に重要な因子を読み解くと、胚中心からの離脱による細胞周期の停止・生存シグナルの増強の 2 つが必要と考えられる。特に生存シグナルの増強に関しては記憶 B 細胞が B 細胞濾胞の辺縁部に局在するという報告を考慮にいれると、濾胞辺縁部に記憶 B 細胞ニッチが存在し、そこへの移行が生存を担保するというアイデアが合理的であるように思われる。しかし、このアイデア、特にニッチの存在自体は仮説の域を全く出していない

2. 研究の目的

記憶 B 細胞生存ニッチに重要な因子・細胞の同定およびニッチへの移行に重要な因子を探索する。

3. 研究の方法

(1) NP 特異的な ERT2-Cre BAFF-R (Tnfsf13c) f/+および BAFF-R +/+マウス由来の B 細胞をマウスに移入したのちレシピエントマウスを NP-CGG で免疫した。免疫 4 週後に NP 特異的胚中心 B 細胞と記憶 B 細胞の数を BAFFf/+と BAFF+/+で比較した。

(2) BAFF-RFP マウスを用いて、脾臓における BAFF 発現細胞を調べた。さらに、抗 BAFF 抗体で染色して、BAFF 発現細胞調べた。

(3) 好中球を除去できる Ym-1 DTR マウス (Ikeda et al., Sci. Immunol., 2018) を用いて、好中球の depletion により記憶 B 細胞が減少するか調べた

(4) 本研究室のデータ (Inoue et al., J. Exp. Med., 2020) から、記憶 B 前駆細胞で EB12 の発現が上昇していることがわかっている。EB12 のリガンドは $7\alpha_2$ -25HC であり、この分子の発現に重要な酵素である Ch25h は濾胞辺縁部に局在する marginal reticular cell (MRC) に発現する。そこで、NP 抗原特異的 ERT2Cre EB12f/f マウスにタモキシフェンを投与した後、このマウス由来 B 細胞をレシピエントマウスに移入し、NP-CGG 免疫で誘導される記憶 B 細胞の数を評価した。

(5) もう一つの B 細胞記憶である長寿命形質細胞の生存ニッチの解析も行なった。長寿命形質細胞のニッチは骨髄に存在すると言われているが、短寿命形質細胞と長寿命形質細胞を識別可能な分子マーカーが存在しなかったために、長寿命形質細胞のニッチ研究は進展してこなかった。そこで、形質細胞の生存期間により長寿命形質細胞を判別するために、新規の形質細胞系統追跡マウスを作製した。このマウスでは、薬剤の投与時に形質細胞が不可逆的に蛍光標識されるが、投与後新規に形成された形質細胞は標識されない。このため、形質細胞が標識後何日生存していたかを判別することができる。この系を用いて、免疫直後に誘導された骨髄形質細胞と標識後 1 ヶ月生存した長寿命形質細胞の動態を解析した。また、骨髄に流入後の形質細胞の数の推移や表現型の変化も解析した。

4. 研究成果

(1) BAFF-R +/+と BAFF-R f/+ B 細胞を競合させると、胚中心 B 細胞の数は変わらないが、記憶 B 細胞の数は BAFF-R+/+と比較して BAFFf/+で減少した。

(2) 脾臓で最も BAFF を発現している細胞は好中球であり、樹状細胞や CD169+マクロファージ、濾胞性ヘルパー T 細胞も BAFF を発現していた。使用した BAFF 抗体では細胞内の BAFF を染色するのは困難であった。しかし、B 細胞の表面に BAFF が高レベルで結合していることがわかった。BAFF の表面の結合レベルは、胚中心 B 細胞と比較して、記憶 B 細胞において高いことがわかった。これは、1) の解析で、記憶 B 細胞は減少するが、胚中心 B 細胞は変化がなかったという結果と一致する。

(3) 脾臓の好中球は 10 分の 1 まで減少したが、この条件において、記憶 B 細胞の減少は観察できなかった。以上のことから、好中球のみの BAFF が記憶 B 細胞の生存を支えているわけではないことが示唆される。

(4) コントロール群と EB12 欠損群で有意な差は得られなかった。

(1)-(4)まとめ

今回の研究では、BAFF-R が記憶 B 細胞の生存に重要であることが示された。リガンドである BAFF は好中球で最も発現が高いが、樹状細胞や CD169+マクロファージ、濾胞性ヘルパーT 細胞も BAFF を発現していた。好中球を depletion しても記憶 B 細胞の減少は見られないことから、他の細胞の BAFF も記憶 B 細胞の生存に寄与している可能性が高い。記憶 B 細胞の濾胞辺縁部への移行には少なくとも EB12 のみではなく、CXCR3 や CCR6 など他のケモカインが関与している可能性が示唆された。

(5) 骨髄に流入直後では動いている形質細胞が観察できるが、全ての長寿命形質細胞は静止していることを明らかにした (図 1A)。骨髄に流入した形質細胞は流入後 2 週間で 1-2 割まで減少し、その後は 2 ヶ月間ほとんど減少しなかった。骨髄流入直後の形質細胞は B220+ MHC-II+ の表現型を示していたが、骨髄に来て 2 週間後には B220- MHC-II- の表現型を示した。このデータは骨髄のある場所に生存に必要なニッチが存在し、そこに形質細胞が静的に存在することが、長期生存に重要である可能性を示唆する (図 1B)。

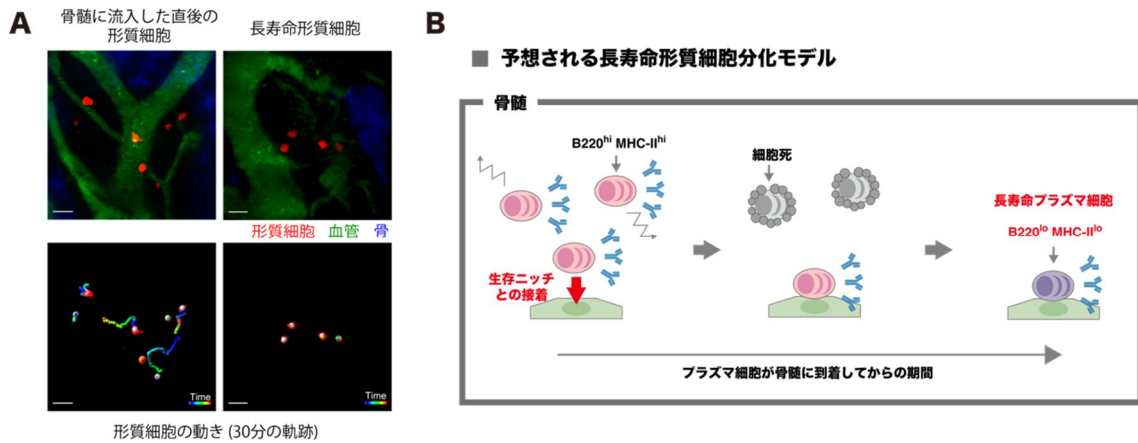


図 1. 骨髄形質細胞の挙動の変化とそれに基づく長寿命形質細胞分化モデル

(A) 骨髄流入直後の形質細胞は動いているが、長寿命形質細胞は静止している。(B) 形質細胞が長寿命化する過程。骨髄に流入した未成熟形質細胞 (B220hi MHC-IIhi)の大部分は死滅するが、一部の細胞は生存ニッチに強く接着し、長寿命形質細胞 (B220lo MHC-IIlo)へと成熟・分化する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koike Takuya, Fujii Kentaro, Kometani Kohei, Butler Noah S., Funakoshi Kenji, Yari Shinya, Kikuta Junichi, Ishii Masaru, Kurosaki Tomohiro, Ise Wataru	4. 巻 220
2. 論文標題 Progressive differentiation toward the long-lived plasma cell compartment in the bone marrow	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20221717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takuya Koike, Kentaro Fujii, Kohei Kometani, Shinya Yari, Junichi Kikuta, Masaru Ishii, Tomohiro Kurosaki, Wataru Ise
2. 発表標題 Genetic tracing of plasma cells reveals cellular dynamism during entry to long-lived compartment
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------